Ablauf der Induktion mikrosomaler Hämoproteine durch die Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital

von

Frank-Ekkehard Kröber

1972

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München

Direktor: Professor Dr. M. KIESE

Ablauf der Induktion mikrosomaler Hämoproteine durch die Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Frank-Ekkehard Kröber

aus Brieg

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Lange

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. M. Kiese

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 4. 1972

Viele Arzneimittel werden im Organismus biochemisch umgebaut. Dadurch werden sie oft weniger wirksam (entgiftet) oder besser wasserlöslich und damit besser ausscheidbar.
Zahlreiche Untersuchungen der letzten 1o bis 15 Jahre haben gezeigt, daß körperfremde Stoffe oxydiert oder reduziert werden durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums der Gewebe. Diese Enzyme kommen in vielen Organen vor. z. B. in der Niere, in der Lunge, hauptsächlich jedoch in der Leber. So kommt es, daß die meisten Untersuchungen mit den Enzymen der Leber vorgenommen werden.
Diese Enzyme sind Bestandteile des endoplasmatischen Retikulums, integriert und strukturgebunden in diesem Netzwerk intrazellulärer Lipoprotein-Membranen. Zur Isolierung dieser Membranen müssen die Zellen zerstört werden. Dabei werden die Schläuche des endoplasmatischen Retikulums zerrissen und es entstehen kleine Bläschen daraus, die man auf Grund ihrer Dichte durch Differentialzentrifugieren von den anderen Zellbestandteilen abtrennen kann. Das abzentrifugierte Pellet heißt Mikrosomenfraktion. Die Mikrosomen enthalten die Enzyme, welche körperfremde lipoidlösliche Stoffe umbauen, noch in strukturgebundener Form.
Die Aktivität der Mikrosomenenzyme kann verändert werden. Sie läßt sich z. B. vermindern durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit Morphin oder erhöhen durch Vorbehandlung mit langwirkenden Barbituraten, z. B. Phenobarbital, mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, z. B. 3, 4-Benzypren, mit chlorierten Kohlenwasserstoffen z. B. Chlorphenothan (DDT) oder mit bestimmten Steroidhormonen. Stoffe, welche in vivo die Menge und Aktivität der mikrosomalen Enzyme erhöhen, nennt man Enzyminduktoren. Diese Enzyminduktoren sind meist Stoffe, die selbst durch die mikrosomalen Enzyme umgebaut werden, zum Teil sind es aber auch Stoffe, welche die Aktivität der mikrosomalen Enzyme hemmen. Man kann

also die Enzyminduktion auffassen als eine Adaptation an ein erhöhtes Angebot umzubauender Stoffe bzw. als eine Reaktion auf die teilweise Hemmung dieses Umbausystems. Die meisten Umbaureaktionen sind mischfunktionelle Oxygenierungen. Das O_2-aktivierende Enzym dieser Reaktionen ist wahrscheinlich das Cytochrom P-45o (vgl. GILLETTE). Es ist ein Hämoprotein und gibt ein charakteristisches Differenzspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm, wenn man das Cytochrom intakter Mikrosomen mit Dithionit reduziert und dann mit CO behandelt. Nicht reduzierte Mikrosomen reagieren nicht mit CO. Der Gehalt der Mikrosomen an diesem Cytochrom nimmt während der Induktion der Mikrosomenenzyme zu.

OMURA und SATO wiesen an Mikrosomen aus Kaninchenleber nach, daß dieses Pigment nach Reduktion mit Dithionit auch mit Äthylisocyanid+ ein auffälliges Differenzspektrum mit zwei Absorptionsmaxima bei 43o nm und bei 455 nm ergibt. Sie fanden eine Konkurrenz von CO und ÄIC um reduziertes Cytochrom P-45o. Die beiden Maxima des ÄIC-Differenzspektrums Dithionit-behandelter Mikrosomen waren in ihrer Höhe vom p_H-Wert der Mikrosomensuspension abhängig (IMAI und SATO 1966b). Bei p_H 6 war nur ein Maximum bei 43o nm vorhanden, oberhalb dieses p_H-Werts nahm das Maximum bei 455 nm mehr zu. Bei p_H 7,4 waren beide Gipfel gleich hoch, wurde die Suspension alkalischer, war der Gipfel bei 455 nm höher als das Maximum bei 43o nm. Die Autoren vermuten, daß das Cytochrom P-45o in der reduzierten Form in zwei ineinander umwandelbaren Formen existiert, die in einem p_H-abhängigen Gleichgewicht stehen. Beide Formen könnten verschiedene Rollen bei Hydroxylierungsprozessen spielen.

+In dieser Arbeit wird für Äthylisocyanid die Abkürzung ÄIC verwendet.

P-450 reagiert auch in der nicht reduzierten Form mit ÄIC (NISHIBAYSHI et al.) Nicht reduzierte Mikrosomen ergeben mit ÄIC ein Maximum bei 434 nm und zwei kleinere bei 550 nm und 599 nm. Die Höhe dieser Maxima ist nicht p_H-abhängig.

Isolierte Mikrosomen enthalten neben P-450 noch ein anderes Hämoprotein, Cytochrom b_5. Es reagiert nicht mit CO, durch die Zugabe von CO wird das Maximum des Cytochrom b_5 auch nicht verändert (KLINGENBERG). Die Bedeutung seiner Anwesenheit in Mikrosomen konnte noch nicht geklärt werden. Cytochrom b_5 und Cytochrom P-450 kommen unter aeroben Bedingungen in isolierten Lebermikrosomen nur in der oxydierten Form vor. Da gereinigtes Cytochrom b_5 nicht mit ÄIC reagiert, ist anzunehmen, daß der Reaktionspartner für ÄIC in den Mikrosomen das Cytochrom P-450 ist. (NISHIBAYSHI et al.)

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, in welchem Umfang die mikrosomalen Cytochrome in Abhängigkeit von der Dauer einer Phenobarbitalbehandlung von Kaninchen zunehmen und ob sich bei dieser Zunahme Eigenschaften der Cytochrome ändern. Die Untersuchungen sollten zur Klärung der Frage beitragen, ob durch Enzyminduktion nur die Menge mischfunktioneller Oxygenasen zunimmt, oder ob sich darüber hinaus auch die Affinität oder die Zugänglichkeit des mikrosomalen Enzymsystems ändern (LANGE, LANGE und THUN, LANGE und STEUBL).

METHODEN

1.) Substanzen

a.) Phenobarbital-Natrium p.a. +

b.) Natrium-Dithionit p.a. +

c.) Äthylalkohol p.a. +

d.) Äthylisocyanid, C_2H_5-N=C= , wurde synthetisiert aus AgCN und Äthyljodid (JACKSON und Mc KUSIK).

ÄIC ist eine bewegliche übelriechende Flüssigkeit. Sie erstarrt bei -66°C, der Kochpunkt liegt bei 79°C/760mmHg, MG = 55,08, Dichte = 0,7423. ÄIC ist schwerlöslich in Wasser, leichter löslich in bestimmten Chlorid- und Sulfatlösungen und explodiert bei raschem Erhitzen auf hohe Temperaturen. Läßt man ÄIC oder seine Verdünnungen unverschlossen stehen, so entwickeln sich sofort Dämpfe mit einem typischen, äußerst unangenehmen Geruch, die nach kurzer Zeit Übelkeit, Benommenheit, Schwindelgefühl und Brechreiz verursachen.

Für die spektralen Messungen wurde das ÄIC nach der Synthese zweimal destilliert. Die resultierende klare ölige Flüssigkeit wurde bei -30°im Dunkeln aufbewahrt, da sie sich bei Zimmertemperatur und Lichteinwirkung unter Rotfärbung zersetzt. Vor Zugabe zu den Miktrosomensuspensionen wurde das ÄIC mit Äthylalkohol verdünnt. Die Verdünnungen wurden bei der Laborarbeit ebenfalls gekühlt und dunkel gehalten, um Veränderungen des ÄIC zu vermeiden.

+Bezogen von der Firma E. Merck, Darmstadt

2.) Behandlung der Tiere und Isolierung der Lebermikrosomen

Männliche und weibliche Tiere einer Mischrasse (mittleres Gewicht 1700 g, Ernährung: Altromin K-$^{+}$ Standardfutter und Wasser ad libitum) wurden bis zu 19 Tagen mit Phenobarbital behandelt. Die Tiere erhielten täglich am Morgen eine Injektion von 40 mg Phenobarbital-Na in 4 ml isotoner NaCl-Lösung/kg s.c. Die Injektionslösung wurde mit HCl auf einen p_H-Wert von etwa 7,4 gebracht. Ausgefallenes Phenobarbital wurde durch Erwärmen kurz vor der Injektion wieder gelöst. Die Kontrolltiere bekamen täglich 4 ml isotone NaCl-Lösung/kg s.c.

24 Stunden nach der letzten Injektion wurden Mikrosomen aus der Leber isoliert. Die Kaninchen wurden durch Nackenschlag getötet und nach Durchtrennung der Carotiden entblutet. Die sofort entnommene Leber wurde von Bindegewebe und größeren Gefäßen freipräpariert und durch ein Sieb mit 1 mm weiten Löchern gepreßt. Der Preßsaft wurde mit zwei Volumina eiskaltem 0,1 M Na-Phosphatpuffer, p_H 7,4, verdünnt und zur Entfernung gröberer Partikel 2o min bei +3^{o}C mit 9000 g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die Mikrosomen mit der Ultrazentrifuge Spinco Modell L 50 als Niederschlag nach 60 min Zentrifugieren bei 78000 g erhalten.

+Hersteller: ALTROGGE Spezialfutterwerk, Lage (Lippe)

3.) Messung der mikrosomalen Cytochrome

Der Gehalt an mikrosomalen Cytochromen wurde durch optische Differenzmessung bestimmt. Die Messungen wurden mit Suspensionen von Mikrosomen aus 0,22 g Leber/ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer (entspricht einem Proteingehalt von 3,5 bis 7,0 mg Protein/ml) durchgeführt. Die genaue Lage der Maxima wurde mit einem registrierenden BECKMAN-Spektralphotometer Modell DK 1 überprüft, die Absorption in den Maxima wurde mit einem BECKMAN-Spektralphotometer Modell DU 2gemessen.

a.) Cytochrom P-450

Die Mikrosomensuspensionen wurden mit einigen Körnchen Dithionit reduziert und 60 sec lang mit CO gesättigt. Die Extinktion dieser Mikrosomensuspensionen wurde im Vergleich zu Suspensionen von Dithionit-reduzierten Mikrosomen ohne CO gemessen. Die Differenz zwischen der Extinktion im Maximum bei 450 nm und der Extinktion bei 500 nm diente als Maß für den Gehalt an Cytochrom P-450. Der Gehalt wurde nicht in Mol angegeben, da ein molarer Extinktionskoeffizient nicht hinreichend genau bekannt ist (Messung am strukturgebundenen System, das bei Mikrosomen unbehandelter und behandelter Tiere verschieden sein kann).

b.) Cytochrom b_5

Die Messküvette enthielt Mikrosomen, denen einige Körnchen Dithionit zugesetzt waren, die Vergleichsküvette Mikrosomen gleicher Konzentration ohne Dithionit. Die Differenz zwischen der Extinktion im Maximum bei 425 nm und der Extinktion bei 500 nm diente als Maß für den Gehalt der Mikrosomen an Cytochrom b_5.

c.) Optische Veränderungen bei der Zugabe von ÄIC zu Dithionit-reduzierten Mikrosomen

Die Mikrosomensuspensionen wurden 1 min unter Stickstoff geschüttelt und anschließend mit 1 mg Dithionit/ml o,1 M Na-Phosphatpuffer reduziert. Die Verwendung einer abgewogenen Menge Dithionit war wichtig, um einerseits das p_H stets konstant zu halten und andererseits eine vollständige Reduktion der Mikrosomen zu gewährleisten. Andere Reduktionsmittel konnten wegen der zu starken p_H-Verschiebung bei vollkommener Reduktion nicht verwendet werden. Die Messküvette (Schichte o,2 cm) enthielt die reduzierten Mikrosomen mit ÄIC in einer Konzentration von $3x10^{-3}$ M(ÄIC zugesetzt in äthanolischer Lösung, 1/3o des Endvolumens), die Vergleichsküvette enthielt mit Dithionit reduzierte Mikrosomen und die entsprechende Menge Äthanol. Die Suspensionen hatten stets einen p_H-Wert von 7,2. Dieser Wert wurde im Verlauf der Messreihen wiederholt mit einem p_H-Meter kontrolliert, da die relative Höhe der beiden Maxima von der Wasserstoffionenkonzentration abhängt (IMAI und SATO 1966 b). Das Differenzspektrum hat zwei Maxima im Soret-Bereich bei 43o nm und 455 nm. Bestimmt wurde die Differenz zwischen der Extinktion in diesen Maxima und der Extinktion bei 500 nm, d.h. $Ext._{430\ nm} - Ext._{500\ nm}$ und $Ext._{455\ nm} - Ext._{500\ nm}$.

Da nicht sicher bekannt ist, mit welchen mikrosomalen Strukturen ÄIC reagiert, wird die durch Zugabe von ÄIC zu Dithionit-reduzierten Mikrosomen optisch erkennbare Verbindung im Folgenden als $ÄIC\text{-}Verbindung_{red.}$ bezeichnet.

d.) Optische Veränderungen bei Zugabe von ÄIC zu nicht reduzierten Mikrosomen unter aeroben Bedingungen

Die Messküvette (Schichte o,2 cm) enthielt Mikrosomen unter aeroben Bedingungen und ÄIC in einer Konzentration von $3x10^{-3}$M (ÄIC zugesetzt in äthanolischer Lösung, 1/30 des Endvolumens), die Vergleichsküvette Mikrosomen unter aeroben Bedingungen mit der entsprechenden Menge Äthanol. Das Differenzspektrum hat ein Maximum im Soret-Bereich bei 434 nm. Bestimmt wurde die Differenz zwischen der Extinktion in diesem Maximum und der Extinktion bei 500 nm.

Da nicht sicher bekannt ist, mit welchen mikrosomalen Strukturen ÄIC reagiert, wird die durch Zugabe von ÄIC zu nicht reduzierten Mikrosomen(unter aeroben Bedingungen) optisch erkennbare Verbindung im Folgenden als ÄIC-Verbindung$_{aerob}$ bezeichnet.

e.) Messung der Abhängigkeit der Extinktion in den Maxima der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ bei 430 nm und 455 nm

5 ml Mikrosomensuspension aus o,22 g Leber/ml o,1 M Na-Phosphatpuffer wurden mit der Ultrazentrifuge SPINCO L 50 mit 90 000• g 1 Stunde lang zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 5 ml o,25 M Na-Phosphatpuffer bzw. o,25 M Tris-Azetatpuffer von verschiedenem p_H-Wert resuspendiert. Diese Mikrosomensuspensionen wurden dann mit 1 mg Dithionit/ml Puffer reduziert, die Wasserstoffionenkonzentration mit einem p_H-Meter bestimmt und die Differenzmaxima bei 430 nm und 455 nm wie oben angegeben gemessen.

Die Verwendung von zwei verschiedenen Puffergemischen war erforderlich, da mit dem Na-Phosphatpuffer bei der zur vollständigen Reduktion notwendigen Dithionitmenge kein höherer p_H-Wert als 7,5 erreicht werden konnte, andererseits aber der Tris-Azetatpuffer keinen ausreichend sauren Bereich besitzt. Der Übergang zwischen den Puffersystemen wurde überlappend gehalten, damit die Kontinuität des Übergangs kontrolliert werden konnte.

f.) Die Bestimmung der optischen Dissoziationskonstante für die Bindung von ÄIC an isolierte Mikrosomen

Für die Ermittlung der optischen Dissoziationskonstante (K_s) bei Dithionit-reduzierten Mikrosomen wurden ÄIC-Konzentrationen zwischen $1o^{-4}$M und$5x10^{-6}$M verwendet, bei nicht reduzierten Mikrosomen zwischen $1o^{-3}$M und $5x10^{-5}$M. Für eine Konzentrationsreihe wurden je 5 verschiedene ÄIC-Konzentrationen hergestellt. Alle Messungen wurden bei einem Proteingehalt von 3 mg Protein/ml durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Biuretmethode (Durchführung nach GORNALL, BARDAWILL and DAVID). Die Begrenzung auf 3 mg Protein/ml sollte vermeiden, daß bei hohen Proteinkonzentrationen die mögliche Bindung von ÄIC an inerte Proteine so groß wird, daß die aktuelle Konzentration an ÄIC im Ansatz abnimmt. Dadurch würde weniger Hämoprotein-ÄIC-Komplex gebildet als der eingesetzten ÄIC-Konzentration entsprechen müßte.

Als Maß für die Bindung von ÄIC unter aeroben Bedingungen wurde die Extinktion im Maximum des Differenzspektrums bei 434 nm verwendet, bei Dithionit-reduzierten Mikrosomen die Extinktion sowohl im Maximum bei 430 nm als auch im Maximum bei 455 nm.

ERGEBNISSE

Änderungen des Cytochromgehalts von Mikrosomen aus Kaninchenleber während 19-tägiger Behandlung der Tiere mit Phenobarbital

Die Änderungen des Cytochromgehalts von Mikrosomen/Gewichtseinheit Leber sind in Abb. 1 wiedergegeben. Der Gehalt an Cytochrom b_5 wurde während der 19-tägigen Behandlung vier- bis fünfmal vermehrt. Der Gehalt an Cytochrom P-450 und die Extiktion im Maximum bei 434 nm der ÄIC-Verbindung$_{aerob}$ und im Maximum bei 430 nm der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ nahmen auf das Acht-bis Neunfache zu. Im Gegensatz zur Extinktion im Maximum bei 430 nm stieg die Extinktion im Maximum bei 455 nm der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ in der gleichen Zeit auf das Dreizehnfache. Das Verhältnis der Extinktionen in den beiden Maxima der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ hat sich also unter der Behandlung mit Phenobarbital geändert. Diese Änderung war nicht durch Unterschiede in der Wasserstoffionenkonzentration der mit Dithionit behandelten Mikrosomensuspensionen bedingt. Die Messungen wurden konstant bei einem p_H von 7,2 durchgeführt, da sich die Relation der Extinktionen in den beiden Maxima mit der Wasserstoffionenkonzentration ändert (IMAI und SATO 1966 b).

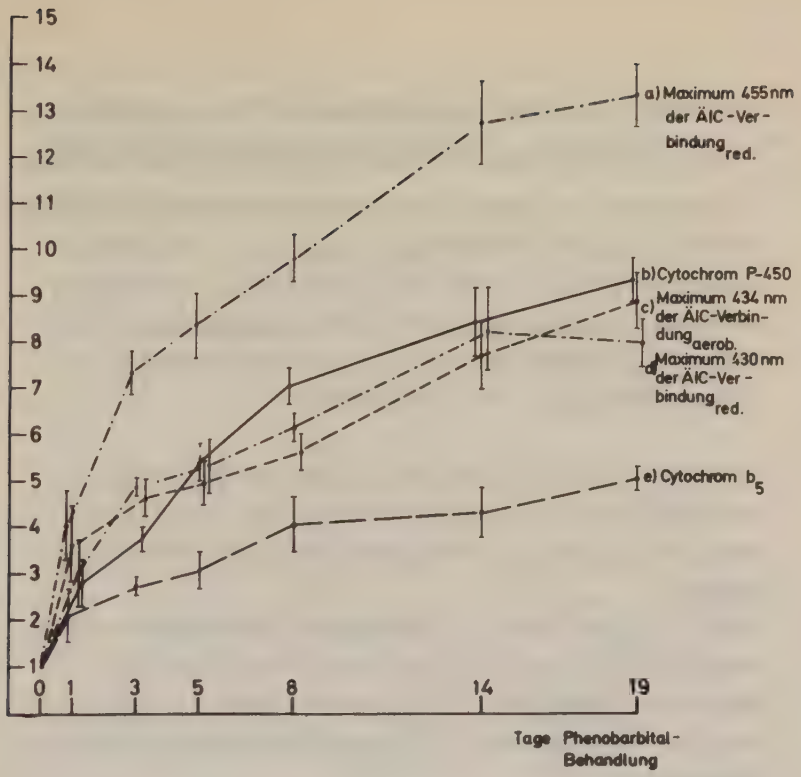

Abb. 1
Änderungen des Cytochromgehalts isolierter Lebermikrosomen von Kaninchen während 19-tägiger Behandlung mit Phenobarbital

Abszisse: Anzahl der Tage, an denen die Tiere mit 40 mg Phenobarbital-Na/kg s.c. behandelt wurden.
Ordinate: Vielfache der Werte unbehandelter Tiere
Kurven: a.) ÄIC-Verbindung$_{red.}$ 455 nm (ΔExt. 455 nm-500 nm)
b.) Cytochrom P450, c.) (ÄIC-Verbindung$_{aerob}$ 434 nm (ΔExt. 434 nm-500 nm), d.) ÄIC-Verbindung$_{red.}$ 430 nm (ΔExt. 430 nm-500 nm),
e.) Cytochrom b_5, Werte von Mikrosomen unbehandelter Tiere
(ΔExt./Mikrosomen aus 0,22 g Leber/ml entspr. ΔExt./mg Protein/ml)
Kurve a = 0,096 $\pm$ 0,008 entspr. 0,027 $\pm$ 0,004, Kurve b = 0,294 $\pm$ 0,023 entspr. 0,084 $\pm$ 0,014, Kurve c = 0,143 $\pm$ 0,013 entspr. 0,041 $\pm$ 0,008, Kurve d = 0,268 $\pm$ 0,014 entspr. 0,077 $\pm$ 0,008, Kurve e = 0,237 $\pm$ 0,010 entspr. 0,068 $\pm$ 0,006

(Zusammensetzung der Messansätze siehe Methoden)

Abhängigkeit der Extinktion in den Maxima 430 nm und 455 nm der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ von der Wasserstoffionenkonzentration

Das Verhältnis der Extinktionen in den beiden Maxima bei 430 nm und 455 nm der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ hängt von der Wasserstoffionenkonzentration ab. IMAI und SATO (1966 b), welche diese beiden Maxima zuerst beschrieben haben, nehmen an, daß sie zwei Formen eines Cytochroms zugehören, die zueinander in einem p_H-abhängigen Gleichgewicht stehen.

Da durch die Behandlung mit Phenobarbital die Extinktion in den beiden Maxima verschieden stark zunahm, wurde untersucht, ob sich deren p_H-Abhängigkeit durch die Vorbehandlung änderte.
In Abb. 2 ist eine solche p_H-Abhängigkeit wiedergegeben und zwar-als Beispiel von 12 Messreihen - je eine Reihe mit Mikrosomen unbehandelter Tiere und eine Reihe mit Mikrosomen von Tieren, welche 8 Tage mit Phenobarbital behandelt worden waren.
Je mehr der p_H-Wert zunahm, desto kleiner wurde die Extinktion im Maximum bei 430 nm und umso größer die im Maximum bei 455 nm. Oberhalb von p_H 7,8 war die Extinktion bei 455 nm größer als die bei 430 nm. Bei p_H 7,8 war die Extinktion in beiden Maxima sowohl bei Mikrosomen von unbehandelten als auch bei Mikrosomen von acht bzw. vierzehn Tage vorbehandelten Tieren gleich groß. Durch die Behandlung wurde also die p_H-abhängige Relation der beiden Maxima zueinander nicht geändert. IMAI und SATO (1966 b) gaben den Schnittpunkt der beiden Kurven bei p_H 7,4 an. In unseren Messungen mit denselben Puffern gleicher Molarität, wie sie von diesen Autoren verwendet wurden, lag er konstant bei 7,8. Die Ursache für diesen Unterschied ist nicht bekannt. Sie könnte in der Verwendung

einer anderen Kaninchenrasse oder in einer anderen Methode der Mikrosomenpräparation liegen.

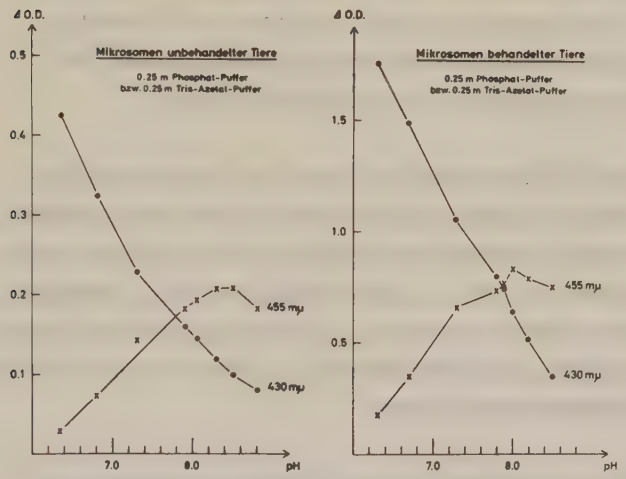

Abb. 2

Abhängigkeit der Extinktion in den Maxima bei 430 nm und 455 nm der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ von der Wasserstoffionenkonzentration

Isolierte Lebermikrosomen von unbehandelten Tieren und von Tieren, die 8 Tage mit 40 mg Phenobarbital-Na/kg s.c. behandelt wurden.

Pufferlösungen: 0,25 M Phosphatpuffer (p_H 6,3 bis p_H 8,0) o,25 M Tris-Acetatpuffer (p_H 8,0 bis 8,8)

Abszisse: Extinktion, Ordinate: Wasserstoffionenkonzentration

Konzentrationen: Mikrosomen aus 0,22 g Leber/ml, Zugabe von 1 mg Dithionit/ml, Äthylisocyanid $3 \cdot 10^{-3}$ M

Die optische Dissoziationskonstante für die Bindung von ÄIC an isolierte Lebermikrosomen unbehandelter und Phenobarbital-behandelter Kaninchen

NISHIBAIASHI, OMURA und SATO fanden bei Mikrosomen unbehandelter Tiere unter aeroben Bedingungen eine optische Dissoziationskonstante (K_S) von 4 bis 9 x 10^{-4}M und bei Dithionit-reduzierten Mikrosomen eine K_S von 10^{-6}M. Vorbehandelte Tiere wurden nicht untersucht.

Da nach Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital die Extinktion im Maximum des Differenzspektrums Dithionit-reduzierter Mikrosomen bei 455 nm stärker zunahm als im Maximum bei 430 nm, andererseits aber die p_H-abhängige Relation der beiden Maxima zueinander gleich blieb, wurde untersucht, ob sich die Affinität der Mikrosomen für ÄIC durch die Vorbehandlung änderte.

Als behandelte Tiere wurden Kaninchen verwendet, die 19 Tage lang Phenobarbital erhalten hatten. Der K_S-Wert der ÄIC-Verbindung$_{aerob}$ war bei Mikrosomen behandelter und unbehandelter Tiere gleich, er betrug jeweils 2 x 10^{-4}M. Dieser Wert entspricht etwa der von NISHIBAIASHI et al. gefundenen Konstante. Dagegen war der K_S-Wert der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ für Mikrosomen behandelter und unbehandelter Tiere verschieden: Während für Mikrosomen unbehandelter Tiere eine ähnliche K_S wie in den Untersuchungen von NISHIBAIASHI et al. gefunden wurde (7x10^{-6}M), lag die Konstante für Mikrosomen behandelter Tiere deutlich höher, nämlich bei 2x10^{-5}M.

Die aus der Extinktion bei 430 nm bzw. bei 455 nm ermittelten Werte waren stets gleich, sowohl bei den Mikrosomen unbehandelter als auch bei den Mikrosomen behandelter Tiere.

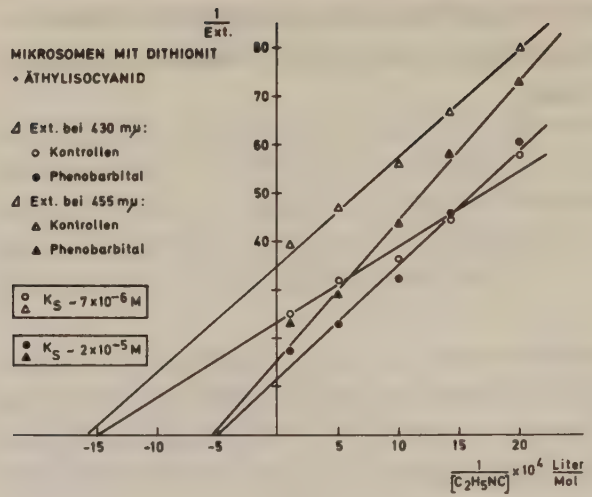

Abb. 3

LINEWEAVER-BURK-Diagramm zur Bestimmung der spektralen Dissoziationskonstante für die Bindung von Äthylisocyanid an Kaninchen-Lebermikrosomen nach Reduktion mit Dithionit

Die Mikrosomensuspensionen wurden mit 1 mg Dithionit/ml 0,1 M Phosphatpuffer, p_H 7,4, reduziert. Äthylisocyanid wurde in äthanolischer Lösung (1/30 des Endvolumens) zugesetzt. Werte von Mikrosomen unbehandelter Kaninchen sind durch offene Symbole (Δ , o) dargestellt, die von Mikrosomen Phenobarbital-behandelter Tiere durch ausgefüllte Symbole (▲ , ●). o, ● = Δ Extinktion 430 nm - 500 nm, Δ , ▲ = Δ Extinktion 455 nm - 500 nm. Proteinkonzentration 3 mg/ml. Die Werte sind Mittel aus 5 Tieren.

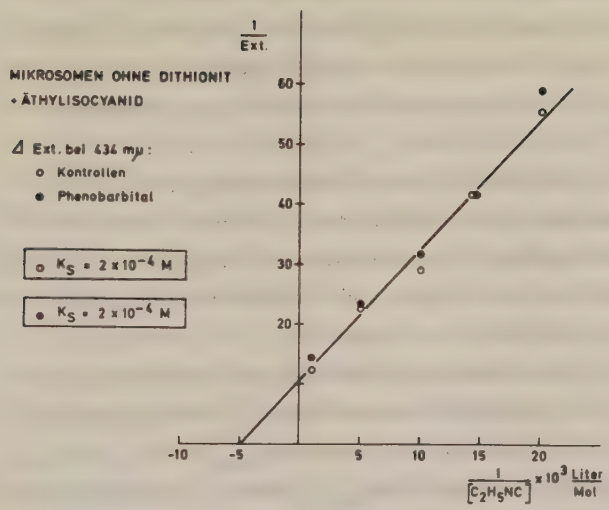

Abb. 4

LINEWEAVER-BURK-Diagramm zur Bestimmung der spektralen Dissoziationskonstante für die Bindung von Äthylisocyanid an Kaninchen-Lebermikrosomen unter aeroben Bedingungen

Mikrosomensuspensionen in 0,1 M Phosphatpuffer von p_H 7,4, ohne Reduktion durch Dithionit. Äthylisocyanid wurde in äthanolischer Lösung (1/30 des Endvolumens) zugesetzt. Werte von Mikrosomen unbehandelter Kaninchen sind durch offene Symbole (o) dargestellt, die von Mikrosomen Phenobarbital-behandelter Tiere durch ausgefüllte Symbole (•). o, • = Δ Extinktion 434 nm - 500 nm.
Proteinkonzentration 3 mg/ml. Die Werte sind Mittel aus 5 Tieren.

DISKUSSION

Während der 19-tägigen Behandlung der Kaninchen mit Phenobarbital nahm der Gehalt isolierter Lebermikrosomen an Cytochrom P-450 stärker zu als der Gehalt an Cytochrom b_5. Diese beiden Cytochrome sind hinsichtlich ihrer Reaktionsfähigkeit, z.B. mit CO oder C_2H_5NC, und in ihrer Funktion in der Zelle verschieden (siehe NISHIBAIASHI et al.) CO reagiert mit dem Eisen im Häm des Cytochrom-P450. ÄIC reagiert wahrscheinlich auch mit diesem Hämoprotein, jedoch ist die Natur der nach Zugabe von ÄIC zu Mikrosomen erkennbaren Verbindungen noch ungeklärt. Die Konzentration dieser ÄIC-Verbindungen nahm während der Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital ebenfalls zu. Die Extinktion im Maximum bei 430 nm der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ und im Maximum bei 434 nm der ÄIC-Verbindung$_{aerob}$ änderten sich gleich stark und in gleichem Maße wie der Gehalt an Cytochrom P-450. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Befunden von NISHIBAIASHI et al., daß einerseits ÄIC unter aeroben Bedingungen an die oxydierte Form von Cytochrom P-450 gebunden wird, andererseits bei Mikrosomen unbehandelter Tiere sowohl die Extinktion im Maximum bei 430 nm als auch die Extinktion im Maximum bei 455 nm der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ dem Gehalt an Cytochom P-450 direkt proportional ist.

Im Gegensatz zu diesen Befunden nahm die Extinktion im Maximum bei 455 nm der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ nicht mehr proportional dem Gehalt an Cytochrom P-450 zu. Die Extinktion dieses Maximums wurde 1,5 mal stärker als die maximale Änderung im Gehalt von Cytochrom P-450 bzw. als die Extinktion im Maximum bei 430 nm der ÄIC- Verbindung$_{red.}$

vermehrt. Dieses verschiedene Verhalten könnte bedingt sein:

1.) durch das Vorhandensein zweier Zustandsformen eines Cytochroms, die sich durch zwei C_2H_5NC-Extinktionsmaxima erkennen lassen und bei Behandlung der Tiere mit Phenobarbital verschieden stark zunehmen.

2.) durch die Bildung eines neuen Cytochroms mit einem ÄIC-Maximum bei 455 nm, dessen Extinktion sich bei der optischen Messung zu der im Maximum des ursprünglichen Cytochroms bei 455 nm addiert.

3.) durch Änderung der Zugänglichkeit bzw. Affinität der reagierenden Gruppen in den Mikrosomen für ÄIC.

Ähnliche Befunde, wie die oben beschriebenen, wurden auch von anderen Autoren erhoben und in ähnlicher Weise gedeutet: SLADEK und MANNERING untersuchten die N-Demethylierung von 3-Methyl-4-Monomethyl-aminoazobenzol durch isolierte Rattenlebermikrosomen bei unbehandelten und mit 3-Methylcholanthren behandelten Tieren. Sie fanden, daß die Demethylierung durch die Behandlung im gleichen Verhältnis vermehrt wurde wie die Extinktion im ÄIC-Maximum bei 455 nm, während die Extinktion im Maximum bei 430 nm durch die Behandlung mit Methylcholanthren nicht zunahm. Außerdem änderte sich das p_H-abhängige Verhältnis zwischen den Extinktionsmaxima bei 430 nm und 455 nm. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen und aus der durch die Behandlung mit 3-Methylcholanthren bewirkten verschieden starken Zunahme und andersartigen Hemmbarkeit zweier N-Demethylierungsreaktionen, daß es sich bei den vorbehandelten Tieren um die Bildung eines neuen Cytochroms

handeln könnte. Diese Annahme wurde durch die verschiedene Beeinflussung der mikrosomalen Substratbindung bei der Induktion durch Methylcholanthren im Gegensatz zu der durch Phenobarbital erhärtet (SHOEMAN, CHAPLIN and MANNERING).

ALVARES et al. fanden bei Versuchen an Ratten, daß bereits nach einmaliger Injektion von 3-Methylcholanthren das Maximum der CO-Verbindung von 450 nm nach 448 nm verschoben wurde. Dieses Ergebnis trat nur auf nach Vorbehandlung der Tiere, nicht nach dem Zusatz von 3-Methylcholanthren zu isolierten Lebermikrosomen. Die Extinktion im Maximum bei 430 nm der $\text{ÄIC-Verbindung}_{\text{red.}}$ stieg nicht an, während die Extinktion im Maximum bei 455 nm auf das Dreifache zunahm. Die Autoren schlossen daraus, daß entweder die Bindung von 3-Methylcholanthren an das Cytochrom in vivo die spektrale Änderung verursacht habe, oder daß ein neues Cytochrom gebildet wurde. Die zweite Annahme sehen die Autoren gestützt durch Befunde, die sie nach Versuchen mit gleichzeitiger Gabe von 3-Methylcholanthren und Äthionin erhoben: Alle oben beschriebenen Effekte von 3-Methylcholanthren wurden durch die gleichzeitige Behandlung mit Äthionin aufgehoben, wahrscheinlich durch Verminderung der Proteinsynthese.

Diese Befunde können aber auch durch die verschieden starke Induktion zweier, schon beim unbehandelten Tier vorhandener P-450-Formen bedingt sein. Hinweise auf die Existenz dieser beiden Formen wurden erst kürzlich durch mehrere Arbeiten wieder in den Vordergrund gerückt (JEFCOATE et al. (1969 a und b), LEIBMAN et al., SHOEMAN et al.). Bisher wurden

jedoch keine Versuche durchgeführt, diese zwei Formen des Cytochrom P-450 mit den zwei möglichen Formen der ÄIC-Verbindung$_{red.}$, welche den beiden Extinktionsmaxima bei 430 nm und bei 455 nm zugrunde liegen könnten, in Korrelation zu bringen.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die an K A N I N C H E N nach Behandlung mit P H E N O B A R B I T A L gewonnen wurden, ist eher eine Zustandsänderung bzw. Veränderung der Zugänglichkeit der reagierenden Gruppen des Cytochroms als die Bildung eines andersartigen Proteins anzunehmen. Folgende Ergebnisse sprechen gegen die Bildung eines neuen Hämoproteins:

Das p_H-abhängige Gleichgewicht zwischen den Maxima bei 430 nm und 455 nm der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ wurde durch die Behandlung der Tiere mit Phenobarbital nicht verändert.
Die Bindungskonstanten für ÄIC, die aus der Extinktion im Maximum 434 nm der ÄIC-Verbindung$_{aerob}$ errechnet wurden, waren bei Mikrosomen behandelter und unbehandelter Tiere gleich groß.
Die Bindungskonstante, die aus der Extinktion bei 430 nm der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ errechnet wurde, war ebenso groß wie die aus der Extinktion im Maximum bei 455 nm errechnete Konstante. Dies gilt sowohl für Mikrosomen der unbehandelten als auch für die der behandelten Tiere. Beide Maxima können demnach mit großer Wahrscheinlichkeit demselben Cytochrom zugeordnet werden. Hätte sich unter der Phenobarbitalgabe ein neues Cytochrom gebildet, das spektrophotometisch in das 455 nm-Maximum eingeht, so wäre zu erwarten, daß bei behandelten Tieren die aus dem Maximum bei 430 nm und aus dem Maximum bei 455 nm errechneten Konstanten verschieden sind.

Für eine Zustandsänderung bzw. Veränderung der Zugänglichkeit der reagierenden Gruppen des Cytochroms als Folge der Phenobarbitalbehandlung sprechen:
Die verschiedene Zunahme der Extinktion in den Maxima bei 430 nm und 455 nm der ÄIC-Verbindung$_{red.}$. Die Änderung des K_S-Werts der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ von 7×10^{-6} M auf 2×10^{-5} M, d.h. also die Abnahme der Affinität der reduzierten Mikrosomen für ÄIC. Dieser Befund steht im Einklang mit Untersuchungen über die Sauerstoffaffinität einiger mikrosomaler Hydroxylasen: KRÖBER et al. fanden für die Dealkylierung, p-Hydroxylierung und N-Hydroxylierung von Anilin eine Vergrößerung des K_M-Werts für Sauerstoff durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Phenobarbital. Da Sauerstoff mit der reduzierten Form des Cytochrom P-450 reagiert, bedeutet auch dieses Ergebnis Abnahme der Affinität des reduzierten Cytochrom als Folge der Vorbehandlung.

Ob über die Änderung der Affinität des Cytochroms hinaus noch die Zugänglichkeit der reagierenden Gruppen z.B. durch Veränderung der Lipoproteinmembranen beeinflußt wird, kann aus den vorliegenden Befunden nicht ausgesagt werden. Entsprechende Untersuchungen sind im Gange (LANGE, unveröffentlichte Versuche).

Die Kenntnis von Änderungen der Affinität und Zugänglichkeit des Cytochrom P-450 hat große theoretische und praktische Bedeutung: Das Cytochrom P-450 ist die terminale Oxidase der in den Mikrosomen ablaufenden Oxygenierungen und damit ein wesentlicher Faktor für die biochemischen Umbaureaktionen.

Durch diese Reaktionen werden zahlreiche körperfremde und körpereigene Stoffe zu Metaboliten umgebaut, die vom Muttermolekül in Art und Stärke der Wirkung sehr verschieden sein können. Wesentliche Änderungen in diesem System könnten demnach nicht nur die Stärke und die Dauer, sondern auch die Art der Wirkung von körperfremden Stoffen (z.B. Arzneimitteln) oder körpereigenen Stoffen (z.B. Steroiden) verändern.

ZUSAMMENFASSUNG

1.) Während 19-tägiger Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbi
nahm der Gehalt isolierter Lebermikrosomen an Cytochrom P-
etwa doppelt so stark zu wie der Gehalt an Cytochrom b_5.

2.) Der Gehalt an der nach Zugabe von Äthylisocyanid zu nicht-
reduzierten Mikrosomen optisch erkennbaren Verbindung
(ÄIC-Verbindung$_{aerob}$) und das Extinktionsmaximum bei 43o n
der nach Reduktion mit Dithionit erkennbaren Äthylisocyani
Verbindung (ÄIC-Verbindung$_{red.}$) änderten sich gleichzeitig
und in gleichem Ausmaß wie der Gehalt an Cytochrom P-45o.

3.) Im Gegensatz dazu nahm die Extinktion im Maximum 455 an
der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ 1,5 mal stärker zu als die Extinkti
im Maximum bei 43o nm bzw. als der Gehalt an Cytochrom P-4

4.) Die Bindungskonstante (K_s) für Äthylisocyanid nahm während
der Phenobarbitalbehandlung der Tiere zu. Dabei war der
Wert, der aus der Extinktion bei 43o nm errechnet wurde,
sowohl bei den unbehandelten als auch bei den behandelten
Tieren ebenso groß wie die aus der Extinktion im Maximum b
455 nm errechnete Konstante. Der entsprechende K_s-Wert,
gemessen ohne Dithionit unter aeroben Bedinungen, blieb
während der Behandlung unverändert.

5.) Das p_H-abhängige Gleichgewicht zwischen dem Extinktions-
Maxima bei 43o nm und 455 nm der ÄIC-Verbindung$_{red.}$ wurde
durch die Behandlung der Tiere mit Phenobarbital nicht
verändert.

6.) Die Befunde geben keinen Anhalt dafür, daß während der Be-
handlung der Tiere mit Phenobarbital ein neues Cytochrom
gebildet wurde. Sie sprechen eher für eine Zustandsänderun
bzw. Veränderung der Zugänglichkeit der reagierenden Grup-
pen des Cytochroms P-45o, wodurch die qualitativen Änderun-
gen des Arzneimittel-umbauenden Systems während der Pheno-
barbitalbehandlung mitbedingt sein können.

LITERATUR

ALVARES, A.P., G.SCHILLING, W.LEVIN and R.KUNTZMAN: Studies on the induction of CO-binding pigments in liver microsomes by phenobarbital.
Biochem. biophys. Res. COmm. 29, 521 (1967)

BEILSTEINS HANDBUCH der org. Chemie, Herausgeb. Friedrich Richter, Vierte Auflage, Springer Berlin 1942
Hauptwerk, Band 4, S.1o7, 1.Ergänzungsband, S.351, 2.Ergänzungsband, S.6oo.

GILLETTE, J.R.: Biochemistry of drug oxydation and reduction by enzymes in hepatic endoplasmic reticulum.
Adv. Pharmacol 4, 219 (1966)

IMAI, Y. and R.SATO: Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes.
Biochem. biophys. Res. Comm. 22. 620 (1966a)

IMAI, Y. and R.SATO: Evidence for two forms of P-450 hemoprotein in microsomal membranes.
Biochem. biophys. Res.Comm. 23,5 (1966b).

IMAI, Y. and R.SATO: Activation and inhibition of microsomal hydroxylation by ethylisocyanide.
Biochem. biophys. Res.Comm. 25,8o (1966c)

JACKSON, H.L. and B.C.Mc KUSICK. In: Organic Syntheses, ed.by T.L.CLAIRNS, vol. 35, p.62.New York: John Wiley and sons, Inc. 1955

JEFCOATE, C.R.E., J.L.GAYLOR and R.L.CALABRESE: Ligand interactions with cytochrome P-450. 1.) Binding of primary amines.
Biochemistry, 8, 3455 (1969a)

JEFCOATE, C.R.E., and J.L.GAYLOR: Ligand interactions with hemoprotein P-450, 2.) Influence of phenobarbital and methylcholanthrene induction processes on P-450 spectra.
Biochemistry, 8, 3464 (1969b)

KLINGENBERG, M: Pigments of rat liever microsomes.
Arch. of Biochem. and Biophys. 75, 376 (1958)
KRÖBER, F., G. LANGE, S. MATHES und G. MOR: Änderung der Affinität isolierter Lebermikrosomen für Anilin, N-Äthyl-anilin, Sauerstoff, Äthylisocyanid und Kohlenmonoxyd durch die Behandlung junger Kaninchen mit Phenobarbital.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 260, 161 (1968)
LANGE, G.: Hydroxylase-Aktivität und Hämoprotein-Gehalt von Mikrosomen aus Kaninchenleber.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 259, 221 (1968)
LANGE, G. und CHR. STEUBL: Änderung der Zusammensetzung mikrosomaler Lipide durch Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 263, 235 (1969)
LANGE, G. und K.-J. THUN: Verschiedene Induktion einiger mikrosomaler Umbaureaktionen von Progesteron durch die Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 264, 266 (1969)
LEIBMAN, K. C., A. G. HILDEBRANDT and R. W. ESTABROOK: Spektrophozometric studies of interactions between various substrates in their binding to microsomal cytochrome P-450.
Biochem. biophys. Res. Comm. 36, 789 (1969)
NISHIBAIASHI, H., T. OMURA and R. SATO: The binding of the ethylisocyanide by hepatic microsomal hemoprotein.
Biochem. Biophys. Acta (Amst.) 118, 651 (1966)
OMURA, T. and R. SATO: A new cytochrome in liver microsomes.
J. of biol. Chem. 237, 1375 (1962)

SLADEK, N. E. and G. J. MANNERING: Evidence for a new P-45o hemoprotein in hepatic microsomes from 3-methylcholanthrene trated rats.
Biochem. biophys. Res. Comm. 24, 668 (1966)
SHOEMAN, D. W., M. D. CHAPLIN and G. J. MANNERING: Induction of drug metabolism. 3.) Further evidence for the formation of a new P-450 hemoprotein after tratment of rats with 3-methylcholanthrene.
Molec. Pharmacol. 5, 412 (1969)

Lebenslauf Frank-Ekkehard Kröber

31.1.43 geb. als Sohn des Hauptmanns d. L. Rolf Kröber und seiner Ehefrau Christa, geb. Jenetzky, in Brieg

17.7.63 Reifeprüfung am Gymnasium Christian-Ernestinum zu Bayreuth

21.1o.63 Immatrikulation in der Universität München Fach: Medizin

27.1o.64 Naturwissenschaftliche Vorprüfung, München

27. 4.66 Ärztliche Vorprüfung, München

9. 6.69 Medizinisches Staatsexamen, München

3o. 8.69 Heirat mit Hiltrud Meyer, Studentin der Philologie

1.1o.69 Medizinalassistent an der Chirurgischen Klinik München-Bogenhausen

1. 3. 71 Medizinalassistent auf der Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Bayreuth

1. 7. 71 Beginn der Ausbildung zum Facharzt für Innere Medizin am gleichen Hause

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80